فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۴- شماره ۳-پاییز ۱۳۹۸

مقاله تحقیقی

تولید اتانول زیستی توسط مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* از گلوکز با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)

علی کاظمی[1*] ، محمد صادق داوری [2]، مهسا شکری [3] ، فواد نعیم آبادی[4]، موسی الرضا محمدی [2]

۱. گروه پرستاری، دانشکده پرستاری و مامایی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحدورامین - پیشوا، ورامین، ایران
۳. گروه دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحدعلوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
۴. گروه پرستاری، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین - پیشوا، ورامین، ایران

***مسئول مکاتبات:** آدرس الکترونیکی: akph615@gmail.com

محل انجام تحقیق: گروه پرستاری، دانشکده پرستاری و مامایی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت:۹۹/۷/۱ تاریخ پذیرش:۹۹/۷/۱۱

چکیده

ساکارومایسس سرویزیه کاربرد های گسترده ای نظیر تولید خمیر مایه نان و اتانول زیستی را دارد. متدولوژی سطح پاسخ یا RSM مجموعه ای از تکنیک های آماری برای ساخت مدل های تجربی است. در این تحقیق تعیین شرایط بهینه تولید اتانول زیستی از نشاسته توسط مخمر با استفاده از روش RSM انجام شد. ابتدا مخمر ساکارومایسس در محیط آگار Yeast Glucose Chloramphenicol (YGC)تکثیرشد. سپس نشاسته ۵ درصد بترتیب توسط سه آنزیم آلفا-آمیلاز، دکستراناز و آنزیم آمیلوگلوکوزیداز به گلوکز هیدرولیز شد.جهت تولید بیواتانول، مخمر ساکارومایسس روی گلوگز حاصل از شکست نشاسته فرآیند تخمیر را درشرایطی که ۲۵۰ میلی لیتر از محلول گلوکز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۵۰rpm در انکوباتور شیکردار به مدت ۳۶ ساعت قرارداده شده بود، انجام داد. مقدار الکل حاصله با دو روش اکسیداسیون دی کرومات و دستگاه الکل سنج ارزیابی و متغییر های دما، زمان (هفته) و میزان اسیدیته بترتیب درمحدوده ۲۵ تا ۹۸ درجه سانتی گراد، هفته اول تا ششم و اسیدیته ۳ تا ۷ درنظر گرفته شد. با ورود داده ها به RSM ، بهترین شرایط ارزیابی شد. طبق داده های برنامه بیشترین تولید الکل در pH= ۴ و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد همچنین در pH= ۷، دمای ۸۰ درجه سانتیگراد در مدت ۵ هفته به میزان ۱۲/۵ میلی لیتر بود. کمترین میزان تولید الکل در مدت ۱ هفته ، در pH= ۷ و دمای ۹۸ درجه سانتی گراد ۳ میلی لیتر بود که درعمل نیز تست شد و همخوانی داشت. استفاده از RSM مزایایی چون افزایش بازده واکنش های شیمیایی، جلوگیری از هدر رفت مواد اولیه، زمان و انرژی را دارا است که می تواند در انواع واکنشهای زیستی استفاده شود.

واژه های کلیدی: ساکارومایسس سروزیه، اتانول زیستی، گلوکز، روش سطح پاسخ

مقدمه

در دهه اخیر استفاده بیش از اندازه از منابع تولید انرژی باعث کاهش ذخایر سوختی شده است، ازین رو با توجه به کاهش سوخت فسیلی نیاز به منابع انرژی تجدیدپذیر احساس می شود. اتانول مایعی بی رنگ، قابل تجزیه، قابل اشتعال که در صنعت به عنوان حلال و ماده واسطه شیمیایی برای تولید بیشتر ترکیبات آلی استفاده می شود. همچنین اتانول مهم ترین سوخت زیستی است که به دلیل داشتن عدد اکتان بالا می تواند به تنهایی به عنوان سوخت و حامل اکسیژن به کار رود (۱). جهت تهیه

الکل از شیوه های تخمیر مواد نشاسته ای و قندی و یا از شیوه های سنتز استفاده می کنند. اتانول درصنعت از دوطریق تولید می گردد، روش اول سنتزی از اتیلن و روش دوم تخمیری. لذا در روش اول، اتانول از اتیلن سنتز می گردد و خود اتیلن از ترکیبات هیدروکربن گازی حاصل از نفت حاصل می گردد پس درنهایت اتانول حاصل از اتیلن منشا فسیلی و نفتی دارد. تمایز اصلی اتانول سنتتیک با بیواتانول این است که اولی ترکیبی تجدیدناپذیر با منشا فسیلی اما دومی ترکیبی تجدیدپذیر با منشا غیر فسیلی می باشد (۲).

مواد اولیه زیستی مورد استفاده در تولید بیواتانول عمدتا منشا گیاهی دارند و به سه گروه قندی، نشاسته ای و سلولزی تقسیم می شوند. مهم ترین، فراوان ترین، ارزان ترین و در دسترس ترین منابع برای تولید اتانول ضایعات صنایعی نظیر کشاورزی می باشد. میکروارگانیسم های مختلفی نظیر مخمرها ، باکتری ها و قارچ ها قادر به تولید بیواتانول هستند (۳). مخمر ساکارومایسس سرویزیه به عنوان مهم ترین مخمر صنعتی مطرح می باشد و کاربرد های تولیدی گسترده ای از جمله تولید خمیر مایه نان و بیواتانول دارد. این مخمر برای انسان و حیوانات غیر بیماری زاست. این مخمر در تولید مخمر نانوایی ، بیواتانول ، مواد دارویی و غیره استفاده می شود. در حال حاضر بیشتر اتانول تولیدی کشور از ملاس نیشکر و چغندر به دست می آید، در حالی که نشاسته نیز یک منبع مناسب و قابل دسترس آسان جهت تولید بیواتانول است. نشاسته پودری سفید رنگ و بدون بو است که در دانه یا ساقه های زیر زمینی همه گیاهان وجود دارد. چهار منبع عمده نشاسته شامل ذرت ، سیب زمینی ، گندم و برنج می باشند (۴).

متدولوژی سطح پاسخ یا RSM مجموعه ای از تکنیک های آماری و ریاضیات کاربردی برای ساخت مدل های تجربی است. هدف در این گونه طرح ها بهینه سازی پاسخ (متغیر خروجی) است که متاثر از چندین متغییر مستقل ورودی می باشد. در RSM فرض می شود که خطاها تصادفی هستند. کاربرد RSM برای بهینه سازی طرح، در کاهش هزینه روش های گران قیمت و بی نظمی های عددی مرتبط با آنها می باشد (۵). گرجی و همکاران درسال ۱۳۸۴ در مطالعه ی تحت عنوان بهینه سازی تولید الکل از نشاسته، با بررسی روش های مختلف هیدرولیز و تخمیر نشاسته برای تولید اتانول عنوان کردند که غلظت و راندمان تولید الکل در روش تیمار آنزیمی – شیمیایی نسبت به سایر روش ها بالاتر می باشد، اما روش سطح پاسخ در آن مطالعه استفاده نشد (۶). اگرچه تولید اتانول زیستی از نشاسته توسط مخمر ها انجام گرفته، اما نکته مهم افزایش راندمان تولید است که این مهم باید در شرایط اپتیمم آزمایشگاهی انجام گیرد، لذا در این تحقیق تولید اتانول زیستی از نشاسته توسط مخمر ساکارومایسس با استفاده از روش سطح پاسخ RSM به منظور تعیین شرایط بهینه انجام شد.

مواد وروش ها

تکثیر مخمر

در این مطالعه از ساکارومایسس سرویزیه صنعتی (شرکت گل مایه، تهران) استفاده شد. جهت تکثیر مخمر از محیط کشت استاندارد گلوکز حاوی گلوکز ۲۰ درصد، عصاره مخمر ۵ درصد، دی هیدروژن پتاسیم ۲ درصد، سولفات منیزیم ۱ درصد، سولفات آمونیوم ۵ درصد و عصاره مالت ۲ درصد در pH = ۴ ، استفاده شد. پس از اندازه گیری مواد مذکور با ترازو تمامی آنها به همراه مخمر در یک ارلن ۲۵۰ سی سی ریخته و به آن ۱۰۰ سی سی آب استریل اضافه شد، سپس در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، زمان ۳۶ ساعت و سرعت ۱۵۰چرخش در دقیقه (فرکانس چرخش) در انکوباتور شیکردار قرارداده شد.

مرحله هیدرولیز

با استفاده از سه آنزیم از خانواده آمیلازها که توانایی هیدرولیز نشاسته را داشتند در دو مرحله هیدرولیز انجام شد. آنزیم ها شامل آلفاآمیلاز باسیلوس لیکنی فورمیس، آمیلوگلیکوزیداز آسپرژیلوس نایجر و مخلوط آنزیمی شاخه شکن دکستراناز بودند که از شرکت نوو نوردیسک تهیه و در تجزیه آنزیمی نشاسته مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله اول با استفاده از آلفا-آمیلاز که خاصیت شکستن شاخه های اصلی را دارد و آنزیم دکستراناز که خاصیت شکستن شاخه های فرعی را دارد انجام شد و طی این مرحله پلی مر نشاسته به مالت تبدیل شد. در مرحله دوم مالت حاصل با استفاده از آنزیم آمیلوگلوکزیداز

به گلوکز تبدیل شد. جهت اندازه گیری قند بدست آمده از هیدرولیز نشاسته محتویات ارلن به روش فهلینگ ab اندازه گیری شد (۱). هرکدام از مراحل فوق به ترتیب در دماها و pH های مختلف اندازه گیری شد اما مقدار نشاسته و مقدار آنزیم ها در تمام مراحل ثابت بود. در مرحله پایانی به منظور تخمیر گلوکز وتولید اتاتول از مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* استفاده گردید. بدین ترتیب که محتویات ارلن (حاوی گلوکز) را در یک بالن ژوژه ۲۵۰ سی سی ریخته و درب بالن را طوری بسته که هوا وارد نشود. سپس بالن در انکوباتور شیکر دار با سرعت ۱۵۰ rpm قرار داده شد. متغیرهای دما ، زمان (هفته) و میزان اسیدیته به ترتیب درمحدوده ۲۵ تا ۹۸ درجه سانتی گراد ، هفته اول تا ششم و اسیدیته ۳ تا ۷ بود.

تعیین غلظت الکل

تعیین میزان اتانول با روش اکسیداسیون دی کرومات

با ریختن دی کرومات روی نمونه دارای الکل، دی کرومات احیا شده که میزان احیا شدن دی کرومات در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه UV اسپکتروفوتومتر خوانده شد.

تعیین میزان اتانول با الکل سنج انالوگ

پس از اتمام زمان انکوباتور شیکر دار محتویات بالن به منظور اندازه گیری اتانول بدست آمده در یک استوانه مدرج ریخته شد و الکل سنج انالوگ را در استوانه مدرج قرار داده و عدد نشان داده شده توسط الکل سنج را یادداشت کرده و به منظور بهینه سازی، عدد یادداشت شده وارد برنامه آماری RSM شد. میزان اتانول ارزیابی شده در دو روش ارزیابی الکل از طرق اکسیداسیون دی کرومات و الکل سنج آنالوگ میزان الکل ارزیابی شد.

روش سطح پاسخ و بهینه سازی نتایج

این روش با معیار قرار دادن تعداد متغییرها، حدود بیشینه و کمینه تعیین شده برای هر متغییر، ماتریس آزمایش را طراحی کرد. زمانی که تعداد متغییر ها زیاد باشد این روش در مقایسه با روش های پر حجمی مانند فاکتوریل کامل ارجحیت دارد که در شرایط خاص (مواردی که آزمایش تجربی نامنظم و غیرسیستمیک است) بسیار مفید می باشد.

تجزیه واریانس و ارائه مدل ریاضی

متغییرهای دما، زمان (هفته) و میزان اسیدیته پارامترهای ورودی بود که وارد معادله سطح پاسخ شد. عموما معادله سطح پاسخ، مدل درجه دوم کامل یا فرم کاهیده آن است. مقدار تولید الکل به ازای هر هفته بر اساس مقادیر واقعی محاسبه شد. از نرم افزار Design Expert 7.1.6 جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات و رسم نمودار های مربوط به روش سطح پاسخ استفاده شد.

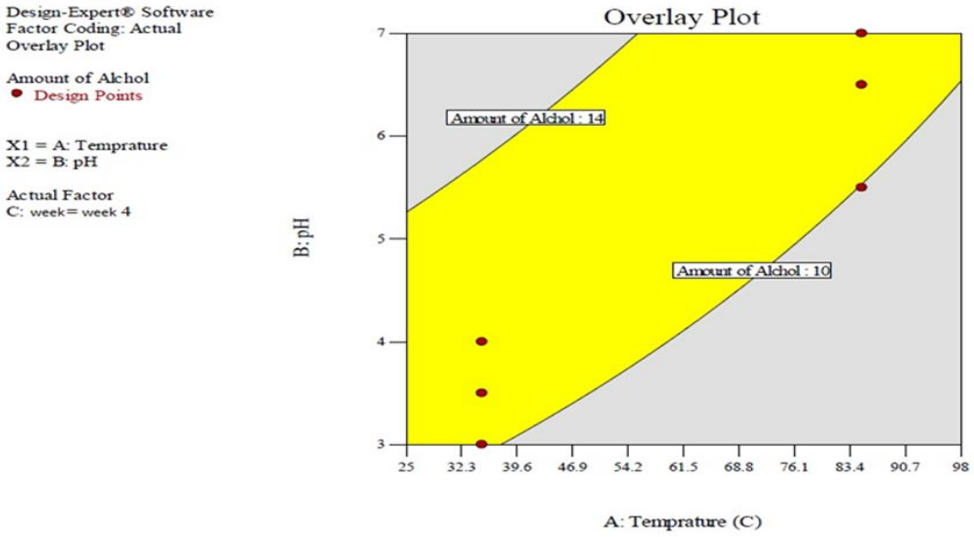
نتایج

بیشترین مقدار الکل درهفته چهارم با ۱۲/۵ میلی لیتر در pH=4 ، دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و pH=7 و دمای ۸۰ درجه سانتی گراد بود درحالیکه کمترین میزان الکل زیستی در هفته اول، در pH= ۷ و دمای ۹۸ درجه سانتی گراد ۳ میلی لیتر بود. مقدار دما برای آنزیم اول ۸۵ و برای آنزیم های دوم و سوم ۳۵ بود. اسیدیته بین ۵/۵ تا ۷ برای آنزیم اول و بین ۳ تا ۴ برای آنزیم های دوم و سوم به عنوان بهترین جواب برای تولید اتانول انتخاب گردید. بیشترین میانگین تولید الکل زیستی در هفته چهارم با میزان ۱۱/۶ میلی لیتر در شرایط مختلف pH و دما بود وکمترین میزان میانگین تولید الکل زیستی در هفته اول به میزان ۳/۶۶ میلی لیتر در شرایط مختلف pH و دما بود. با ارزیابی دما در هفته های مختلف بنظر می رسد دمای بالا فاکتور اثرگذار مهمی در میزان تولید الکل زیستی باشد. در مورد pH نیز pH بالا در محدوده خنثی عامل مثبت ومهمی در افزایش میزان میانگین تولید الکل زیستی در هر هفته دارد (جدول ۱).

با ورود متغییرها به معادله سطح پاسخ، نمودار همپوشانی میزان تولید الکل با توجه به سه متغییر زمان، دما و اسیدیته در هفته چهارم نشان داده شده است که نقاط قرمز رنگ میزان الکل قابل تولید را نشان می دهد. سطح زیر منحنی کل میزان الکل تولیدی در هفته مورد نظر نشان می دهد (نمودار ۱).

جدول ۱- میانگین میزان تولید الکل زیستی در طی شش هفته با توجه به شرایط مختلف اسیدیته و دما.

میزان نشاسته	زمان (هفته)	اسیدیته (pH)	دما (سانتی گراد)	میانگین میزان الکل زیستی (میلی لیتر)
۵ درصد	۱	۷-۳	۹۸-۲۵	۳/±۶۶ ۰/۱
۵ درصد	۲	۷-۳	۹۸-۲۵	۶/۱±۰/۳
۵ درصد	۳	۷-۳	۹۸-۲۵	۵/۸ ±۰/۲
۵ درصد	۴	۷-۳	۹۸-۲۵	۱۱/۱۶ ±۰/۸
۵ درصد	۵	۷-۳	۹۸-۲۵	۱۰/۸۳ ±۰/۶
۵ درصد	۶	۷-۳	۹۸-۲۵	۷/۵ ±۰/۵



نمودار ۱- نمودار همپوشانی میزان تولید الکل با توجه به سه متغییر زمان ، دما و اسیدیته درهفته چهارم.

با ارائه داده های حاصل به نرم افزار آماری 7.1.6 Design Expert جهت رگرسیون داده های تجربی، مقادیر R-Squared، Adj R-Squared و Pred R-Squared تائید کننده رگرسیون قابل قبول بودند. R-Squared ضریب تعیین است و Pred R-Squared معادله ی رگرسیون را تخمین می زند. Adequate Precision: مختص روش سطح پاسخ است، و دقت کافی نام دارد، که نسبت علائم واقعی را نسبت به علائم آزمایشی مورد استفاده مشخص می کند. مقدار R-Squared برابر با ۰/۹۸۵ بیان می کند که بیش از ۹۸/۵ درصد از داده های تجربی با مدل پیشنهادی قابل توصیف هستند و تنها حدود ۱ درصد خطا در پیش بینی داده ها وجود دارد. از طرفی پارامترهای ضریب تغییرات و Adequate precision نیز معرف نسبت های انحراف از معیار به مقدار متوسط است که مقادیر کمتر برای ضریب تغییرات و مقادیر بالاتر از ۴ برای Adequate precision مطلوب است (جدول ۲).

بحث

امروزه بیواتانول مصارف عمده ای همچون ضدعفونی کننده، استفاده به عنوان سوخت، حلال ترکیبات شیمیایی مختلف و غیره دارد. مواد اولیه زیستی مورد استفاده در تولید بیواتانول عمدتاً منشاء گیاهی دارند که دراین مطالعه تولید اتانول زیستی از نشاسته توسط مخمر ساکارومایسس با استفاده از روش سطح پاسخ RSM به

منظور تعیین شرایط بهینه انجام شد. نتایج نشان داد که برای هر هفته ماکزیمم مقدار الکل تولیدی در چه دما و pH قابل دستیابی بود. با توجه به کارهای آماری انجام شده در این تحقیق از طریق روش سطح پاسخ، هفته های بهینه (هفته ی ۴ ،۵ و ۶) بودند و مناسب ترین هفته، هفته ی چهارم تشخیص داده شد. مقدار دما برای آنزیم اول ۸۵ و برای آنزیم های دوم و سوم ۳۵ بود. اسیدیته بین ۵/۵ تا ۷ برای آنزیم اول و بین ۳ تا ۴ برای آنزیم های دوم و سوم به عنوان بهترین جواب برای تولید اتانول انتخاب گردید. در نتیجه روش تجربی-آزمایشگاهی از طریق روش سطح پاسخ تأیید شد و همخوانی بسیار مناسبی نشان داد ($P<0.05$).

جدول ۲ - گزاره های آماری تایید کننده رگراسیون داده های تجربی.

انحراف استاندارد	۰/۴۹
میانگین	۷/۵۳
ضریب تغییرات (درصد)	۶/۵۶
R-Squared	۰/۹۸۵
Pred. R-Squared	۰/۹۳۵
Adequate Precision	۲۵/۶۲

اونر درسال ۲۰۰۶ در مطالعه ای تحت عنوان بهینه سازی تولید اتانول از نشاسته توسط گونه ی مخمر *ساکارومایسس سروزیه*، شرایط آزمایشگاهی مختلف را مورد بررسی قرار داد، نتایج تجربی اش با نتایج بهینه سازی اش بسیار مشابه بودند، مانند تحقیق ما بالاترین اتانول تولیدی نتایج تجربی با نتایج سطح پاسخ همخوانی داشت احتمالا باتوجه به اینکه تمام شرایط دومطالعه یکسان بود (۷). پارادیپ و همکاران در سال ۲۰۱۲ مطالعه ای تحت عنوان بهینه سازی فرآیند تولید اتانول از طریق گندمیان انگشتی با استفاده از روش سطح پاسخ را انجام دادند. متغیرهای بهینه شده عبارت بودند از: غلظت عصاره مخمر، سولفات منیزیم و pH محیط که پس از بهینه سازی متغیرها، غلظت اتانول به میزان ۱۳/۶۶ درصد به دست آمد. مقادیر پیش بینی شده برای شرایط فرآیند بهینه سازی با داده های تجربی همخوانی خوبی داشتند. تایید مدل نشان داد که تفاوت معنی داری بین مقادیر پیش بینی شده و مشاهده شده وجود نداشت (۸). راتنام و همکاران در سال ۲۰۰۳ مطالعه ای تحت عنوان تولید اتانول از نشاسته ی درخت نخل در مرحله ی تخمیر و در غلظت های مختلف را انجام دادند. غلظت بهینه مشخص شد و بعد بهترین شرایط تولید اتانول تخمیر زمان ۱۷ ساعت و اسیدیته ۲ و دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد برای غلظت ۱۴۰ گرم در لیتر نشاسته بدست آمد که از طریق روش سطح پاسخ بدست آمد. در ضمن غلظت بهینه ی مشخص شده توسط روش سطح پاسخ با توجه زمان و هزینه با روش تجربی کاملا" همخوانی داشت (۹). درمطالعه فوق از نشاسته درخت نخل استفاده شد و فاکتورهای بهینه شرایط درمطالعه فوق با مطالعه ما تفاوت داشت که احتمالا به دلیل نوع تفاوت درنشاسته مصرفی باشد.

ادنان شریل و همکارانش در سال ۲۰۱۴ مطالعه ای تحت عنوان بهینه سازی تولید بیواتانول از گلیسرول از طریق اشریشیا کُلی با روش سطح پاسخ را مورد بررسی قرار دادند. شرایط بهینه برای تولید بیواتانول تعیین شد و نتایج حاصله در مقایسه با فرآیند تئوری نزدیک به عملکرد بود، یعنی در واقع بازدهی تولید اتانول حاصل از تمام غلظت های گلیسرول تست شد، و زمانی که فرآیند دسته ای در شرایط بهینه انجام شد، به عملکرد تئوری نزدیک بود (۱۰). آرضی و همکاران در سال ۱۳۹۱مطالعه ای تحت عنوان تولید سوخت زیستی بیواتانول از ضایعات نشاسته‌ای سیب زمینی با استفاده از آنزیم آلفاآمیلاز حاصل از سویه بومی *Bacillus licheniformis* جداسازی شده از چشمه آبگرم قینرجه (استان اردبیل) را انجام داد و شرایط بهینه را از طریق روش بهینه سازی سطح پاسخ بدست آورد. نتایج حاصل از بهینه‌سازی فعالیت آلفاآمیلاز در واکنش سنجش آنزیمی نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و pH برابر با ۷ می‌باشد، که این امر با نتایج تحقیق ما در مورد آنزیم اول

کاملا" همخوانی داشت و آن را تأیید می کند (۱۱). در مطالعه فوق از ضایعات سیب زمینی استفاده و در مطالعه ما از نشاسته استفاده شد، باتوجه به ماهیت نشاسته ای بودن ماده اولیه در هر دو مطالعه فعالیت آنزیم در هر مطالعه کاملا مطابقت داشت اما در مورد pH احتمالا بدلیل کاربرد سویه *باسیلوس لیکنی فورمیس* تفاوت با مطالعه حاضر مشاهده شد.

دانگ و همکارانش در سال ۲۰۱۲ مطالعه ای تحت عنوان بهینه سازی یک محیط کشت مصنوعی برای تولید اتانول توسط مخمر *Zymomonas mobilis* با استفاده از روش سطح پاسخ را انجام دادند. آنها ۱۹ محیط کشت مورد بررسی قرار دادند. هشت مورد از این مؤلفه ها اثرات قابل توجهی بر تولید اتانول داشتند. تولید اتانول به طور مستقیم با لگاریتم غلظت تری سدیم سیترات در محدوده ی آزمایشگاهی ۰/۱ تا ۱/۱ گرم بر لیتر ارتباط و هماهنگی داشت، که محدوده ی شرایط آزمایشگاهی را هم تأیید می کرد (۱۲). در مطالعه دانگ نوع محیط کشت در تکثیر مهم مدنظر بود در حالیکه در مطالعه ما ارزیابی روش RSM و مطابقت با روش تجربی بود.

جبرگرگ و همکارانش در سال ۲۰۱۶ مطالعه ای تحت عنوان تولید اتانول صنعتی از پوست موز برای کشورهای در حال توسعه و بهینه سازی روش از طریق سطح پاسخ را انجام دادند. آنها در واقع از پوست موز برای تولید اتانول از طریق مخمر *ساکارو مایسس سروزیه* استفاده کردند و اثرات عوامل هیدرولیز را مورد بررسی قرار دادند و ترکیبی بهینه از عوامل با طرح های سطح پاسخ پیدا کردند. تجزیه و تحلیل ضریب همبستگی واریانس ۰/۸۶۵ =R^2 و R^2 تعدیل شده= ۰/۹۷۸۲ نشان دهنده ی ارزیابی بسیار خوبی داده های تجربی توسط مدل رگرسیون چند جمله ای مرتبه ی دوم است. این مقدار همبستگی داده های تجربی توانایی روش سطح پاسخ را در صحت و درستی شرایط آزمایشگاهی تأیید می کند (۱۳). در مطالعه فوق از پوست موز جهت تخمیر اولیه استفاده نمودند در حالیکه در مطالعه ما از نشاسته استفاده شد و ضریب همبستگی واریانس تقریبا مشابه بود.

ال گندی و همکارانش در سال ۲۰۱۳ مطالعه ای تحت عنوان طراحی و بهینه سازی فرآیند تخمیر ملاس چغندر قند توسط *ساکارومایسس سروزیه* (*Saccharomyces cerevisiae*) با استفاده از روش سطح پاسخ را انجام دادند. روش RSM سطح پاسخ بر اساس طراحی مرکزی نمای کامپوزیت به منظور ارزیابی و بهینه سازی شرایط برای تولید حداکثر بیواتانول انجام شد. اهمیت دوره ی انکوباسیون، pH اولیه، دمای انکوباسیون و غلظت ملاس در عملکرد بیواتانول مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از معادله ی مدل، تولید حداکثر اتانول در شرایط بهینه ۲۵۵ گرم در لیتر در اسیدیته ی ۵/۶ و دمای ۳۸ درجه ی سانتی گراد بدست آمد که با شرایط آزمایشگاهی آن همخوانی بالائی با مطالعه حاضر داشت. (۱۴). در مطالعه فوق از ملاس چغندر قند و در مطالعه حاضر از نشاسته استفاده گردید و تفاوت میزان تولید الکل حاصله در دو مطالعه احتمالا ناشی از تفاوت در نوع ماده اولیه بوده است در حالیکه سایر شرایط pH و دما تقریبا نزدیک یکدیگر بود و تولید الکل ارتباط با ساکارومایسس سرویزیه بهتر از سایر ارگانیسم ها بود.

نتیجه گیری

در همه ی موارد ذکر شده، روش سطح پاسخ بهترین و بهینه ترین شرایط را برای تولید اتانول تعیین کرده و همخوانی نتیجه ی روش تجربی با نتیجه ی مُدل ارائه شده توسط روش سطح پاسخ تأیید شده است. در واقع بیشترین میزان تولید اتانول در هر روش تعیین و شرایط آزمایشگاهی مناسب ارائه شده است، لذا جهت تولید بیواتانول با بالاترین راندمان و کمترین هزینه می توان از روش سطح پاسخ بهره لازم برده شود و توصیه به کاربرد این روش درمدل های آزمایشگاهی می گردد.

تقدیر وتشکر

بدینوسیله از جناب آقای دکتر سید حسین طباطبایی بابت درا ختیار قرار دادن آزمایشگاه تشکر و قدردانی می گردد. در این تحقیق از لحاظ اخلاقی نیازی به اخذ کد اخلاق با توجه به مواد وروش کار نبود.

تضاد منافع این تحقیق تعارض منافع نداشت و با هزینه شخصی انجام شد.

منابع مورد استفاده

1. Wang, F., Jiang, Y., Guo, W., Niu, K., Zhang, R., Hou, Sh., 2016. An environmentally friendly and productive process for bioethanol production from potato waste. Biotechnol Biofuels 9: 1-8.
2. Liu, X., Xu, W., Mao, L., Zhang, C., Yan, P., Xu, Z., 2016. Ligno-cellulosic ethanol production by starch-base industrial yeast under PEG detoxification. Sci Rep 3: 20361.
3. Celińska, E., Borkowska, M., Białas, W., 2016. Evaluation of a recombinant insect-derived amylase performance in simultaneous saccharification and fermentation process with industrial yeasts. Appl Microbiol Biotechnol 100: 2693-2707.
4. Smerilli, M., Neureiter, M., Wurz, S., Haas, C., Frühauf, S., Fuchs, W., 2015. Direct fermentation of potato starch and potato residues to lactic acid by *Geobacillus stearothermophilus* under non-sterile conditions. J Chem Technol Biotechnol 90: 648-657.
5. Sasikumar, E., Viruthagiri, T., 2008. Optimization of process conditions using response surface methodology (RSM) for ethanol production from pretreated sugarcane bagasse: Kinetics and modeling. Bio Energ Res 1: 239-247.
6. Gorji, M. A., 2005. Study on hydrolysis and starch fermentation methods for bioethanol production. 4th National Conference of Iranian Biotechnology. 2005 June 14-16, Kerman, Iran. https://www.civilica.com/Paper-NBCI04-NBCI04_241.html.
7. Oner, E. T., 2006. Optimization of ethanol production from starch by an amylolytic nuclear petite *Saccharomyces cerevisiae* strain. Yeast 23: 849-56.
8. Pradeep, P., Sarathi Reddy, O. V., Rama Mohan, P., Ko, S., 2012. Process optimization for ethanol production from very high gravity (VHG) finger millet medium using response surface methodology. Iranian J Biotech 10: 168-174.
9. Ratnam, B. V. V., Narasimha Rao, M., Damodar Rao, M., Subba Rao, S., Ayyanna, C., 2003. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch using response surface methodology. World J Microb Biotech 19: 523-526.
10. Adnan Sheril, N. A. A., Suhaimi, S. N., Suraini, A. A., Ali Hassan, M., Phang, L. Y., 2014. Optimization of bioethanol production from glycerol by *Escherichia coli* SS1. Renew Energ 66: 625-633.
11. Arezi, I., 2012. Bioethanol fuel production from waste potato starch by α-amylase of indigenous strain *Bacillus licheniformis* isolated from Ghirencheh fountain (Ardabil Province) [Dissertation]. Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University; 2012.
12. Dong, H. N., Zhao, X. M., Ma, Y. Y., Zhang, M., 2012. Optimization of a synthetic medium for ethanol production by xylose-fermenting *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. Chin Sci Bull 57: 3782-3789.
13. Gebregergs, A., Gebresemati, M., Sahu, O., 2016. Industrial ethanol from banana peels for developing countries: Response surface methodology, Pacific Science Review A: Natul Sci Eng 18: 22-29.
14. El-Gendy, N., Madian, H. R., Amr, S. S., 2013. Design and optimization of a process for sugarcane molasses fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. Int J Microbiol 2013: 815631.